临床研究

Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+细胞分析

钟运超,黄静静,张骞予,张 康
广西梧州市人民医院肿瘤科,广西 梧州 543000

摘要:目的 探讨Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg (Treg)细胞的百分比情况。**方法** 选择本院肿瘤科收治的33例Ⅳ期非小细胞肺癌患者和16例健康对照组人群,均在接受治疗前空腹抽取外周血样本并在流式细胞仪上做Treg细胞的测定。**结果** Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血Treg细胞百分比水平为(10.16±7.43)%,健康对照组为(11.93±4.78)%,两者比较无明显差异(P>0.05);若以患者的Treg细胞百分比平均值10%为基线,发现全组病例只有39.39%(13/33)的患者外周血Treg细胞百分比高于基线水平。**结论** Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血Treg细胞整体水平并不高于健康人群;但部分病例存在百分比增高现象。可为临床提供资料。

关键词:非小细胞肺癌;外周血;CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞;Ⅳ期

肺癌的发生,发展与机体免疫平衡有关,其中T淋巴细胞为主的细胞免疫在其中起重要作用;而T淋巴细胞亚群中CD4+CD25+FOXP3+调节性T细胞是一群具有免疫抑制活性细胞,参与肺癌微环境中抑制机体免疫应答作用。据文献报道[1-2]肺癌患者外周血的CD4+CD25+FOXP3+细胞数量明显增多,且随肿瘤进展及分期升高而逐渐升高,导致肿瘤免疫逃逸。但也有不同的文献报道[3]肺癌患者外周血的Treg细胞数量虽然增多,但肺癌Ⅰ期-Ⅳ期间没有明显差异。为了深入了解这种情况,本文就Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+细胞的分布问题也作研究。拟为临床提供资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料

取2013年1月~2014年12月在我院肿瘤科住院的Ⅳ期(TNM分期)非小细胞肺癌患者33例。男27例,女6例。中位年龄53岁。全部病例均取得病理诊断,其中鳞癌29例,腺癌3例。其他1例。每1病例均在首次治疗前空腹抽外周血6 mL送检。同时收集16例正常人群空腹抽外周血6 mL作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 CD4 percp(BD Bioscences),CD25 FITC(BD Bioscences),FOXP3(BD Bioscences),FACS™ Permeabilizing Solution2(10×)(BD Bioscences),BD FACS™ lysing Solution(10×)(BD Bioscences),PBS由博士德生物工程有限公司生产,台式离心机Labofuge 400R Thermo Fisher产品;BD FACSCalibur流式细胞仪(BECTON DICKNSON),漩涡混均仪(VORTEX-GENIE)。

1.2.2 检测方法 依据实验Panel为样本管编号,将待用抗体置于冰盒上备用。在试管中按Panel加入试剂规格要求的膜表面抗;根据细胞计数结果加入适量的样本量;低速混匀3 s,室温孵育20 min;向每个试管中加入红细胞裂解液2 mL,混匀,在室温避光10 min;温育后立即在室温离心1500 r/min,5 min;弃上清,加2 mLPBS重悬,低速混匀3 s,室温离心1500 r/min,5 min,倒掉上清;加入1 mL破膜剂室温避光10 min,室温离心1500 r/min,5 min,弃上清;加2 mL PBS洗涤,低速混匀3 s,室温离心1500 r/min,5 min,弃上清;加入细胞内标记抗体,低速混匀3 s,室温孵育30 min;向试管中加2 mLPBS重悬,低速混匀3 s,室温离心1000 r/min,5 min,倒掉上清;最后加入0.5 mL含1%多聚甲醛PBS重悬,上机检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS16.0统计学软件进行处理。计数资料用百分比表示,计量资料用均数±标准差表示,组间用两均数t检验比较,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg占CD4+CD25+细胞百分比水平与健康对照组的无明显差异(P>0.05),两组方差齐性分析:F=1.176,P=0.284;说明两组方差齐。检测组与健康对照组比较,t=0.868,P=0.39,t检验95%区间为(-2.335, 5.878)。若以检测组Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg占CD4+CD25+细胞平均值10%为基线,将全组病例细分为低于基线和高于基线水平两组,结果显示:全组病例外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg占CD4+CD25+细胞百分比低于基线占

收稿日期:2016-03-11
作者简介:钟运超,主治医师,本科,E-mail: 214878684@qq.com
通信作者:张 康,主任医师,硕士研究生,E-mail: zlk2827120@126.com

60.61%(20/33)；而高于基线水平占39.39%(13/33)。

3 讨论

自身免疫性疾病是自身反应性T淋巴细胞在一定条件下针对自身组织所起的免疫反应，引起组织损伤的一组疾病。而肿瘤是正常组织在一定的条件下出现的细胞突变而成的。同时会表达一些肿瘤相关抗原，如CEA等。一般认为肿瘤相关抗原是机体的自身抗原成分，因此肿瘤免疫从某种程度上说是一种自身免疫。理论上肿瘤患者体内也存在自身反应性T细胞，它能识别这些相关抗原，并引起适宜的反应，消除这些肿瘤细胞。但实际上，临床并没有观察到免疫排斥肿瘤组织的现象，而是促进肿瘤产生，增大和转移等。增多的Treg细胞在肿瘤局部与CD8+T细胞之间相互作用抑制杀伤性T细胞的作用。因此虽然肿瘤患者体内有一定数量的CTL细胞存在，却不能诱导有效的抗肿瘤免疫应答来抑制肿瘤生长[4]。说明在肿瘤生长过程中，Treg细胞增多总是伴随抗肿瘤免疫的存在的[5]。肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞表面也表达CTLA-4标记，CTLA-4是Treg表面的免疫治疗的靶点[6]。Ipilimumab单抗为针对CTLA-4人源化抗体，可以封闭CTLA-4信号通路，阻断CTLA-4与APC表面的协调刺激分子B7结合介导的抑制性信号，从而激活T细胞，提高特异性抗肿瘤免疫反应[7]。肺癌患者外周血的CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞数量较正常人群明显增多；且随肿瘤进展逐渐升高，使Ⅳ期比Ⅰ期肺癌患者外周血的CD4+CD25+FOXP3+细胞数量明显升高(P<0.05)[1-2]。理论上，这些肺癌患者如果用Ipilimumab单抗封闭CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞，就会提高机体抗肿瘤免疫反应，取得很好缩小肿瘤的效果。然而临床上用Ipilimumab单抗免疫治疗晚期恶性黑色素瘤患者，取得客观有效率也只有10%~15%[8]。在肺癌方面，据2014年ASCO年会数据显示：联合应用nivolumab和Ipilimumab治疗非小细胞肺癌患者后，其客观应答率也只有22%，疾病稳定率33%[9]。但大部分患者没有取得客观效果。原因值得研究。而本研究结果显示：Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞的数量百分比并没有比正常对照组人群的为高，没有统计学差异(P>0.05)。与相关文献报道[10]相似。这可能与本研究病例数较少，或者可能与晚期肿瘤增大诱导血管内皮生长因子(VEGF)增多有关。据文献报道[11-12]VEGF对CD34+造血干细胞向树突状细胞(DC)的分化具有强烈的抑制作用。不但可以抑制DC成熟，还可以阻断DC的抗原递呈作用，抑制DC等抗原递呈细胞的分化，进一步影响细胞毒T细胞的扩增，活化及免疫杀伤作用。推测由于晚期肿瘤增大，VEGF也伴随增多，对DC细胞活化受到抑制也会增强，DC细胞就没有能力递呈肿瘤抗原通过双信号激活T细胞。没有活化的T细胞，就不会伴随负反馈的Treg细胞出现，可以部分解释Ⅳ期非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞的数量百分比并没有比正常对照组人群的高的现象。

就肿瘤个体化精准医学而言，可将本研究病例的外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg占CD4+CD25+细胞平均值10%为基线分层分析，发现本研究组的39.39%的病例存在CD4+CD25+FOXP3+细胞的数量百分比增高的现象。那么这部分病例采用Ipilimumab单抗或其他方法抑制或清除CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞就可以提高机体抗癌功能，通过恢复机体抗肿瘤免疫使肺癌患者肿瘤缩小，达到延长生存期的目的。因此这项研究结果可能为临床选择免疫治疗合适的对象提供指导参考。值得进一步研究。

参考文献：

[1] 郭 净, 刘忠达, 张尊敬. 非小细胞肺癌患者外周血CD4+CD25+FOXP3+调节性T细胞的研究[J]. 中国基层医药, 2015, 22(4): 510-3.
[2] 李 莎, 李 岩, 梁 婧, 等. 非小细胞肺癌患者外周血FOXP3+调节T细胞和Th17的检测与临床意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(7): 642-6.
[3] 梁 晶. 肺癌患者外周血Treg细胞与IL-10, TGF-b检测及其临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(11): 1980-3.
[4] 李京有, 姜乃德, 林乐胜. 转录因子FOXP3在肺癌患者中的表达及其临床意义[J]. 临床医学工程, 2010, 17(1): 31-3.
[5] Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P, et al. The immune system-is it relevant to Cancer development, progression and treatment[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2008, 20(2): 101-12.
[6] 王平章, 马大龙. 调节性T细胞免疫治疗策略[J]. 中国医药生物技术, 2015, 10(1): 53-8.
[7] Hodi FS, O'day SJ, Mcdermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma[J]. N Engl J Med, 2010, 363(8): 711-23.
[8] 任 军, 黄红艳. 靶向免疫检查点的肿瘤免疫现状及趋势[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(7): 415-9.
[9] Johnson DB, Rioth MJ, Horn L. Immune checkpoint inhibitor in NSCLC[M]. New york: springer science+Bussiness media, 2014.
[10] 张 康, 钟运超, 黄静静. Ⅳ期恶性肿瘤患者外周血CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞的测定[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(5): 713-4.
[11] Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate Cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(3): 854-9.
[12] Takahashi A, Kono K, Itakura J, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric Cancer[J]. Oncology, 2002, 62(2): 121-7.